

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang lingkup Penelitian

Ruang lingkup pada penelitian ini mencakup bidang ilmu Histologi, Patologi Anatomi, dan Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

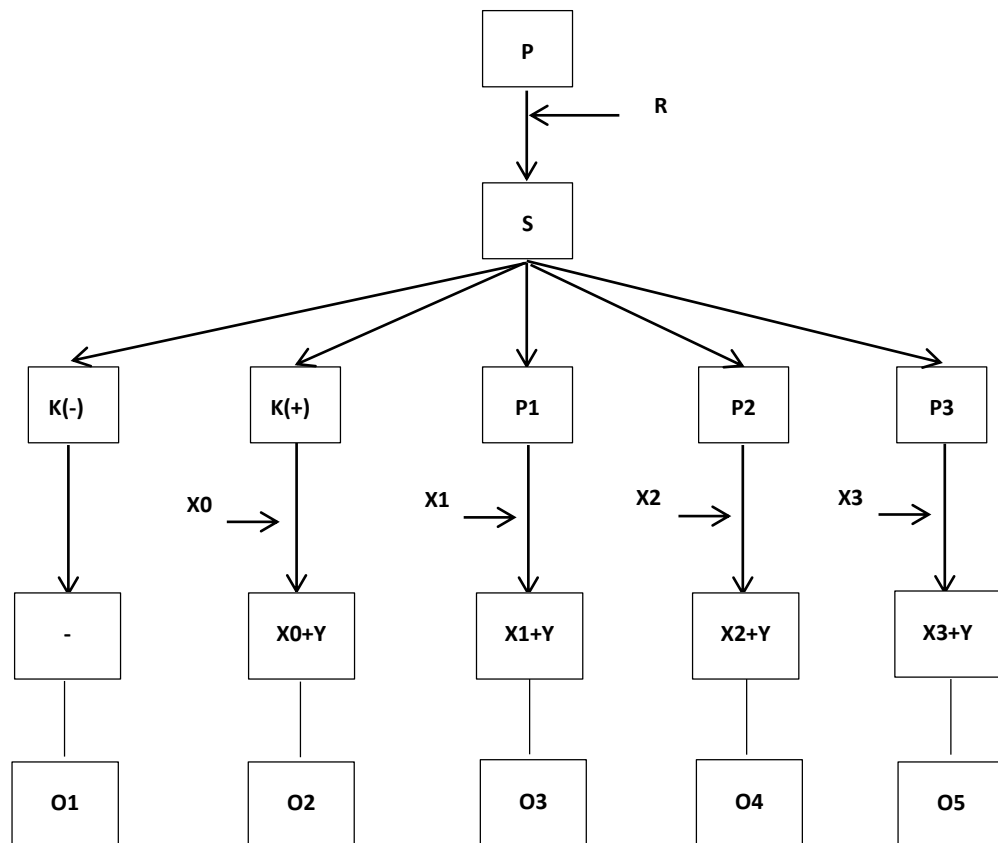
Penelitian, pengumpulan dan analisa data dilakukan pada bulan Februari - September 2017.

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk tempat pemeliharaan serta perlakuan hewan coba. Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro untuk pembuatan ekstrak etanol 95% daun kelor (*Moringa oleifera*) dan pembuatan preparat histopatologi gaster hewan coba. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro untuk melakukan interpretasi hasil mikroskopis gaster hewan coba.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design* yang menggunakan tikus wistar sebagai hewan coba.

Skema rancangan penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 5. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan:

P = Populasi.

S = Kelompok Sampel.

R = Randomisasi.

X0 = Tikus wistar diberi aquadest

X1 = Tikus wistar diberi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB/hari

X2 = Tikus wistar diberi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB/hari

- X3 = Tikus wistar diberi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB/hari
- Y = Tikus wistar diberi formalin peroral 100 mg/kgBB/hari
- = Tanpa diberi perlakuan apapun
- K (-) = (-)
- K (+) = X0 selama 5 hari pertama, dilanjutkan X0+Y selama 21 hari
- P1 = X1 selama 5 hari pertama, dilanjutkan X1+Y selama 21 hari
- P2 = X2 selama 5 hari pertama, dilanjutkan X2+Y selama 21 hari
- P3 = X3 selama 5 hari pertama, dilanjutkan X3+Y selama 21 hari
- O1 = Observasi gambaran mikroskopis gaster X0
- O2 = Observasi gambaran mikroskopis gaster X1
- O3 = Observasi gambaran mikroskopis gaster X2
- O4 = Observasi gambaran mikroskopis gaster X3
- O5 = Observasi gambaran mikroskopis gaster Y

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

3.4.3 Sampel

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus wistar Jantan.
2. Berat badan rata-rata 150-250 gram.

3. Umur 2-3 bulan.
4. Tikus dalam keadaan sehat dan aktif bergerak.
5. Tidak terdapat kelainan anatomi.

3.4.3.2 Kriteria *Drop Out*

- 1) Mati pada saat penelitian berlangsung.
- 2) Perilaku berubah (lemah dan tidak aktif bergerak).

3.4.4 Cara pengambilan sampel

Sampling pada penelitian ini dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*) untuk menghindari bias karena variasi faktor umur dan berat badan. Randomisasi langsung dapat dilakukan karena sampel yang diambil dari tikus wistar sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen. Semuanya diambil secara acak dari kelompok tikus yang sudah diadaptasi pakan selama 1 minggu.

3.4.5 Besar sampel

Besar sampel mengacu pada pedoman (*World Health Organization*) WHO mengenai penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental.²⁹ Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan minimal 5 ekor. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 25 ekor tikus strain wistar jantan karena terdapat 5 kelompok, tiap kelompok masing masing berjumlah 5 ekor.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis bertingkat pada hewan coba yang diberikan secara peroral.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah gambaran mikroskopis gaster tikus wistar yang diinduksi formalin.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

Jenis Variabel	Nama Variabel	Definisi Operasional	Unit	Skala
Bebas	Pemberian ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>).	Ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) menggunakan ekstraksi maserasi multistahap dengan menggunakan etanol. Dosis yang digunakan adalah dosis bertingkat yang diberikan pada kelompok hewan coba perlakuan 1 (P1) dosis 200 mg/kgBB, perlakuan 2 (P2) dosis 400 mg/kgBB, dan perlakuan 3 (P3) dosis 800 mg/kgBB dengan sonde sebanyak satu kali sehari selama 21 hari. P1, P2 dan P3 diberikan perlakuan preventif terlebih dahulu dengan diberikan ekstrak daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>) dosis bertingkat yang sesuai dengan dosis tiap kelompok perlakuan 5 hari sebelumnya.	mg/kgBB	Ordinal

Tergantung	Gambaran mikroskopis gaster tikus wistar yang diinduksi formalin.	Gambaran mikroskopis gaster tikus wistar baru dapat dinilai setelah dilakukan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang.	skor integritas epitel mukosa berdasarkan modifikasi <i>Barthel Manja</i> . ³⁰ 0 : Tidak ada perubahan patologis 1:Deskuamasi epitel 2: Erosi permukaan epitel (gap 1-10 sel epitel/lesi) 3: Ulserasi epitel (gap >10 sel epitel/lesi)	Ordinal
------------	---	---	---	---------

Tabel 3. Kriteria Pembacaan Derajat Histopatologi Gaster Skoring Modifikasi Barthel Manja³⁰

Skor	Integritas Epitel Mukosa
0	Tidak ada perubahan patologis
1	Deskuamasi epitel
2	Erosi permukaan epitel (1-10 sel epitel/lesi)
3	Ulserasi epitel (>10 sel epitel/lesi)

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan Penelitian

1) Pembuatan ekstrak

1. Daun kelor (*Moringa oleifera*).
2. Etanol 95%.
3. Larutan aquades.
4. Polyethilen-glycol (PEG) 1.25%.

2) Perawatan dan perlakuan hewan coba

1. 25 ekor tikus wistar jantan.
2. Pakan dan minum standar secara *ad libitum*.
3. Formalin 100 mg/kgBB.
4. Ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*).

3) Pembuatan preparat histologi

1. Larutan buffer formalin 10%.
2. Hematoksilin Eosin.
3. Larutan xylol.
4. Alkohol bertingkat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%.
5. Larutan aquades.

3.7.2 Alat Penelitian

3.7.2.1 Pembuatan ekstrak

1. Erlenmeyer.
2. Pisau.
3. Waterbath.
4. Gelas ukur.

3.7.2.2 Perawatan dan perlakuan hewan coba

1. Kandang hewan coba.
2. Timbangan hewan coba.
3. Sonde lambung *syringe*.
4. Tabung penampung.

3.7.2.2 Alat pembuatan preparat histologi

1. Deckglass.
2. Objekglass.
3. Mikrotom.
4. Oven.
5. Cetakan paraffin.
6. Mikroskop cahaya.
7. Alat bedah minor (untuk mengambil organ gaster tikus).
8. Kamera.

3.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan pada penelitian ini adalah data primer hasil pengamatan gambaran mikroskopis gaster tikus wistar dari kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Cara Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Daun kelor (*Moringa oleifera*) dibersihkan dan dipotong-potong lalu di biarkan ditempat terbuka. Daun yang sudah agak mengering diletakkan dalam tabung erlenmeyer yang telah terisi etanol 95% kemudian dilakukan maserasi selama 24 jam dengan pengulangan 2-3 kali, lalu menyaring campuran tersebut dengan kain lunak untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian dilakukan penguapan pada suhu 60-70⁰C. Setelah itu akan didapatkan ekstrak dalam bentuk gel.

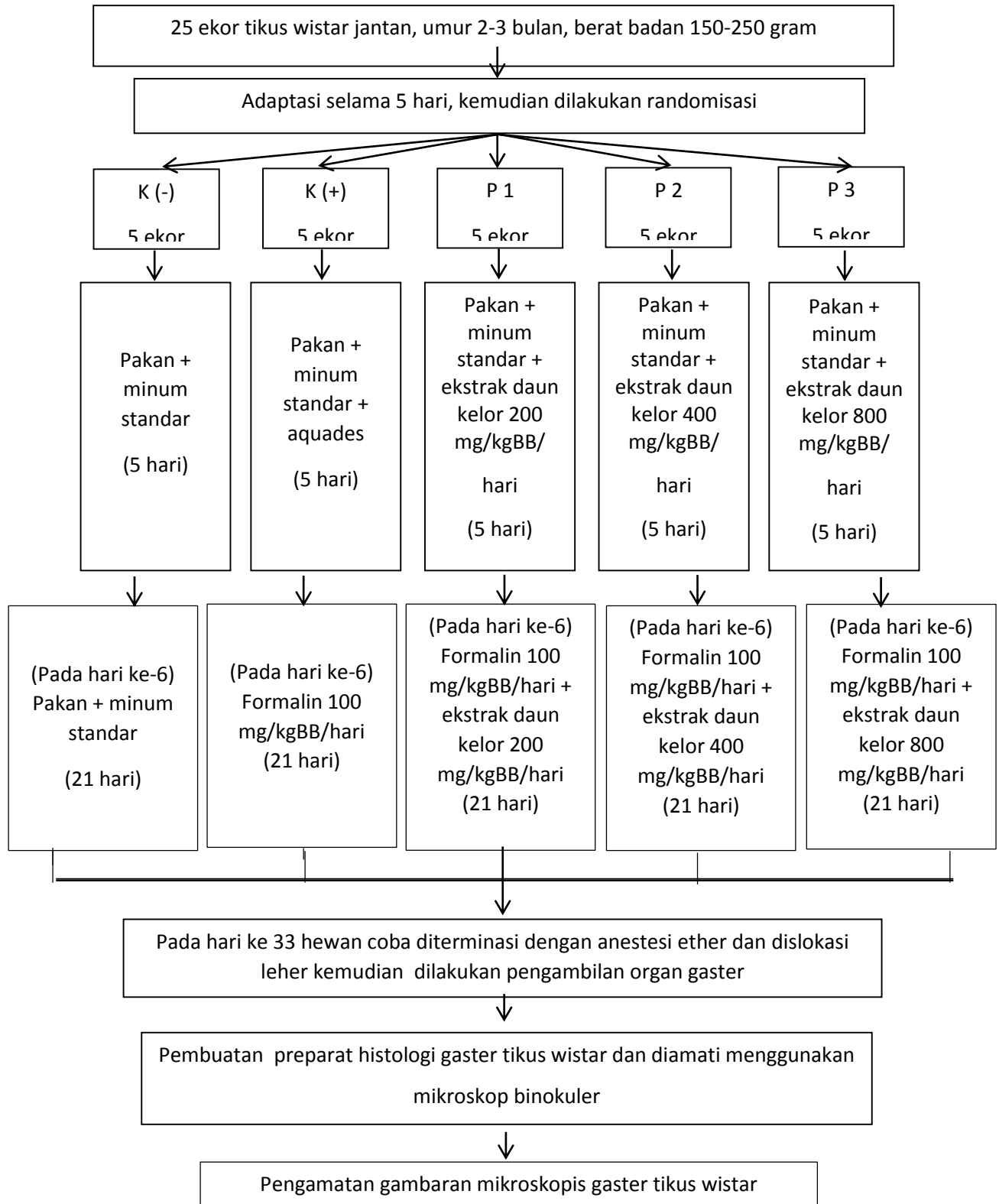
3.7.4.2 Perlakuan pada Hewan Coba

- 1) 25 ekor tikus wistar yang memenuhi kriteria inklusi diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dalam kandang tunggal dan diberi pakan standar serta minum *ad libitum*.
- 2) Pada hari ke-8, tikus wistar dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus wistar yang dipilih berdasarkan *simple random sampling*.
- 3) Menimbang berat badan masing-masing tikus wistar.
- 4) Mulai hari ke-8 pada kelompok pertama yaitu kelompok kontrol negatif, diberikan pakan standar dan aquadest tanpa perlakuan apapun.
- 5) Pada kelompok kedua yaitu kelompok kontrol positif, tikus wistar diberikan pakan standar dan aquadest selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari selama 21 hari.
- 6) Kelompok Perlakuan 1, diberikan pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 200 mg/kgBB/hari selama 21 hari.
- 7) Kelompok Perlakuan 2, diberikan pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 400 mg/kgBB/hari selama 21 hari.
- 8) Kelompok Perlakuan 3, diberikan pakan standar dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB/hari selama 5 hari dan

dilanjutkan pemberian formalin peroral 100 mg/kgBB/hari dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis 800 mg/kgBB/hari selama 21 hari.

- 9) Tikus wistar di lakukan anestesi terlebih dahulu lalu dimatikan dengan cara dislokasi leher.
- 10) Mengambil organ gaster, sampel gaster tersebut kemudian diukur dan ditimbang, diamati secara makroskopik selanjutnya diletakkan pada tabung berisi cairan pengawet buffer formalin 10% dengan perbandingan 1 bagian gaster dan 9 bagian buffer formalin 10%.
- 11) Tabung berisi sampel gaster tikus wistar diletakkan ke rak tabung kemudian diserahkan ke analis guna mengolahnya mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE). Dari setiap sampel gaster dibuat preparat dengan potongan longitudinal dan akan dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu dari keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan pembesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah perubahan gambaran histopatologis gaster pada tikus wistar yaitu deskuamasi epitel, erosi permukaan epitel dan ulserasi epitel.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 6. Alur Penelitian

3.9 Analisis Data

Jenis rancangan hipotesis yang digunakan pada penelitian ini adalah hipotesis komparatif numerik dengan lebih dari dua kelompok yang tidak berpasangan. Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 21.0. Uji normalitas menggunakan uji *saphiro-wilk* dengan hasil distribusi datanya tidak normal, kemudian data ditransformasi. Setelah ditransformasi tetap didapatkan distribusi data yang tidak normal atau tidak sama, maka dilakukan uji statistik non parametrik. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak daun kelor, dilakukan uji *Rank Spearman*. Dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*, didapat $p \leq 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* (*Mann Whitney test*).

3.10 Etika Penelitian

Penelitian telah mendapat *Ethhical Clearence No.29/EC/H/FK-RSDK/2017* tanggal 2 Juni 2017 dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro sebelum penelitian dilakukan. Tikus wistar dipelihara di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Hewan diberi makan dan minuman *ad libitum*. Untuk perlakuan, hewan coba diberikan pakan kemudian formalin dicampur dengan akuades lalu disondekan pada pagi hari setelah itu diberikan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dosis bertingkat menggunakan sonde pada sore harinya. Hewan diterminasi dengan cara dislokasi leher dengan sebelumnya dilakukan anestesi terlebih dahulu. Pembuatan preparat sesuai dengan metode baku histopatologis pemeriksaan jaringan. Seluruh biaya yang dikeluarkan untuk penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti.

